

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
8. Juli 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/057003 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82,  
9/88, 9/10, 9/92, 9/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/014649

(22) Internationales Anmeldedatum:  
19. Dezember 2003 (19.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 61 188.2 20. Dezember 2002 (20.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): METANOMICS GMBH & CO. KGAA [DE/DE];  
Tegeler Weg 33, 10589 Berlin-Charlottenburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMITZ, Oliver  
[DE/DE]; Johannes-Brahms-Str.16, 14624 Dall-  
gow-Döberitz (DE). PUZIO, Piotr [DE/DE]; Edel-  
trautweg 21, 13505 Berlin (DE). BLAU, Astrid [DE/DE];  
Rotkehlchenweg 33, 14532 Stahnsdorf (DE). LOOSER,  
Ralf [DE/DE]; Hauptstr. 2, 13158 Berlin (DE). WEN-  
DEL, Birgit [DE/DE]; Feuerbachstr.53, 12163 Berlin  
(DE). KAMLAGE, Beate [DE/DE]; Hektorstr.19, 10711  
Berlin (DE). PLESCH, Gunnar [DE/DE]; Plantagenstr.  
16a, 14482 Potsdam (DE).

(74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; BASF Aktiengesellschaft,  
67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING AMINOACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN MITTELS TRANSGENER ORGANISMEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing aminoacids in transgenic organisms. The inventive method consists of the following steps: a) introduction of nucleic acids sequence which codes threonine decomposing protein or lysine decomposing protein or codes threonine decomposing protein and lysine decomposing protein, b) introduction of nucleic acids sequence which improves the decomposition of threonine or lysine or the decomposition of threonine and lysine in the transgenic organisms; c) expression of (a) or (b) nucleic acids sequence in a transgenic organism. In a very useful manner, the nucleic acids sequence is introduced in the step a) of the method, said sequence being selected from: i) the nucleic acids sequence with the sequence present in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 and/or SEQ ID NO:25; ii) the nucleic acids sequence which is preserved as a result of a degenerate genetic code by re-recording aminoacids sequence present in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24 and/or 26; and iii) a derivative of the nucleic acid sequence present in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 and/or SEQ ID NO:25 which codes polypeptides with the nucleic acids sequence present in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24 and/or 26 and which comprises at least 50 % of homology in terms of aminoacids without reducing the biological activity of polypeptides.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren folgende Schritte umfasst: a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Threonin-abbauendes Protein oder Lysin-abbauendes Protein codiert oder für ein Threonin-abbauendes Protein und Lysin-abbauendes Protein codiert, oder b) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz, die den Threoninabbau oder Lysinabbau oder den Threoninabbau und Lysinabbau in den transgenen Organismen erhöht und c) Expression einer unter (a) oder (b) genannten Nukleinsäuresequenz im transgenen Organismus. Vorteilhaft wird in Verfahrensschritt (a) eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 und/oder SEQ ID NO: 25 dargestellten Sequenz; ii) einer Nukleinsäuresequenz, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 und/oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Aminosäuresequenz erhalten wird und iii) eines Derivats der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 und/oder SEQ ID NO: 25 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 und/oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Aminosäuresequenz codiert und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist; eingebracht.

WO 2004/057003 A3



KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:**

14. Oktober 2004

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/14649

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7    C12N15/82    C12N9/88    C12N9/10    C12N9/92    C12N9/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7    C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 930 367 A (BASF AG ; KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE)) 21 July 1999 (1999-07-21) the whole document	1-25
X	----- MONSCHAU N ET AL: "THREONINE ALDOLASE OVEREXPRESSION PLUS THREONINE SUPPLEMENTATION ENHANCED RIBOFLAVIN PRODUCTION IN ASHBYA GOSSYPYII" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 64, no. 11, November 1998 (1998-11), pages 4283-4290, XP000857901 ISSN: 0099-2240 the whole document	1-25
A	----- US 2002/123118 A1 (ALLEN STEPHEN M ET AL) 5 September 2002 (2002-09-05) pages 48-49; claim 6 -----	1-25
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">14 April 2004</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">12.08.2004</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Meyer, W</div>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/EP 03/14649****Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See additional sheet.**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-25 (in part)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**PCT/EP 03/14649**

**Box II**

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-25 (in part)

Method for producing amino acids by introducing into an organism nucleic acid sequences that code for a threonine-decomposing protein.

2. Claims 1-25 (in part)

Method for producing amino acids by introducing into an organism nucleic acid sequences that code for a threonine-decomposing protein.

Inventions 3-10

Claim 26 (in part)

Amino acids, the amino acid sequences of which are described using SEQ ID NOs: 3-10.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/14649

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0930367	A	21-07-1999	DE 19840709 A1	24-06-1999
			CA 2255284 A1	22-06-1999
			CN 1225944 A	18-08-1999
			EP 0930367 A2	21-07-1999
			JP 11243976 A	14-09-1999
-----				
US 2002123118	A1	05-09-2002	NONE	
-----				

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14649

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N9/88 C12N9/10 C12N9/92 C12N9/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, Sequence Search

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 930 367 A (BASF AG ; KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE)) 21. Juli 1999 (1999-07-21) das ganze Dokument	1-25
X	MONSCHAU N ET AL: "THREONINE ALDOLASE OVEREXPRESSION PLUS THREONINE SUPPLEMENTATION ENHANCED RIBOFLAVIN PRODUCTION IN ASHBYA GOSSYPHII" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 64, Nr. 11, November 1998 (1998-11), Seiten 4283-4290, XP000857901 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	1-25
A	US 2002/123118 A1 (ALLEN STEPHEN M ET AL) 5. September 2002 (2002-09-05) Seiten 48-49; Anspruch 6	1-25



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. April 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12. 08. 2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Meyer, W

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-25 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

## 1. Ansprüche: 1-25 (teilweise)

Methode zur Herstellung von Aminosäuren durch das Einbringen in einem Organismus von Nukleinsäuresequenzen welcher für ein Threonin-abbauendes Protein kodiert

---

## 2. Ansprüche: 1-25 (teilweise)

Methode zur Herstellung von Aminosäuren durch das Einbringen in einem Organismus von Nukleinsäuresequenzen welcher für ein Threonin-abbauendes Protein kodiert

---

## Erfindungen 3-10

Anspruch 26 (teilweise)  
Aminosäuren deren Aminosäuresequenzen mit der SEQ ID NO. 3-10 beschrieben sind

---

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

**PCT/EP 03/14649**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0930367	A	21-07-1999	DE	19840709 A1		24-06-1999
			CA	2255284 A1		22-06-1999
			CN	1225944 A		18-08-1999
			EP	0930367 A2		21-07-1999
			JP	11243976 A		14-09-1999
<hr/>						
US 2002123118	A1	05-09-2002	KEINE			
<hr/>						